



Artículo

Efectos del agua ozonizada sobre microorganismos patógenos y alterantes de frutas y hortalizas

Effects of ozonated water on pathogens and spoilage microorganisms of fruits and vegetables

Laura Frisón^{1*}, Marcos Vissani¹, Horacio Ocampo², Darío Ponisio², Juan Basílico¹

¹Cátedra de Microbiología, Departamento de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. Santiago del Estero 2829 (3000), Santa Fe, Argentina.

²Empresa Agua Ozonizada Santo Tomé (3016), Santa Fe, Argentina.

*Autora para correspondencia: lfrison@fiq.unl.edu.ar

Aceptado 07-Junio-2013

Resumen

La demanda de productos mínimamente procesados es creciente. Su inocuidad es un tema que preocupa tanto a procesadores, como a agencias de regulación y a consumidores. Las industrias han tenido que buscar métodos más eficaces para evitar el deterioro por microorganismos y mejorar la vida útil. Se considera que una sanitización es segura si el sanitizante logra reducir 5 log (99,999 % eficiencia) la concentración de bacterias y 4 log (99,99 % eficiencia) la concentración de mohos. Se estudió el efecto del agua ozonizada sobre bacterias patógenas como *Bacillus cereus*, *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp. y sobre hongos fitopatógenos, micotoxigénicos y alterantes de frutas y hortalizas como *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum*, *Alternaria alternata* y *Cladosporium cladosporioides*. Se realizaron ensayos *in vitro* mediante el Test de Suspensión a 2 concentraciones de ozono en agua y 4 tiempos de exposición. Se logró determinar el siguiente orden descendente de resistencia en bacterias: *B. cereus*, *Pseudomonas* sp., *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella* sp. Se logró determinar el siguiente orden descendente de resistencia en mohos: *A. niger*, *P. digitatum*, *A. alternata* y *C. cladosporioides*. Se realizaron ensayos sobre hojas de lechuga, que contenían inoculadas las bacterias en estudio, con agua ozonizada ([2 ppm], por 5 minutos) y sobre naranjas enteras, que

contenían inoculadas conidios de los mohos en estudio, con agua ozonizada ([3 ppm], por 15 minutos). En ninguno de los ensayos se logró reducir más de 3 log la concentración de microorganismos. Teniendo en cuenta que las altas concentraciones de microorganismos inoculados en los ensayos (10^6 - 10^7 células/mL para bacterias y 10^5 - 10^6 conidios/mL para mohos) no se encuentran normalmente en estos alimentos frescos, se puede inferir que el ozono podría utilizarse como sanitizante.

Palabras claves: agua ozonizada, control de microorganismos patógenos y alterantes, productos mínimamente procesados, sanitización de frutas y hortalizas.

Abstract

The demand for minimally processed products is growing. Safety is a subject that concerns both processors, as consumers and regulatory agencies. Industries have had to find more effective methods to prevent spoilage by microorganisms and improve shelf-life. Sanitization is considered safe if the sanitizer is able to reduce 5 log (99,999 % efficiency) the concentration of bacteria and 4 log (99,99 % efficiency) the concentration of fungi. The ozonated water effect on pathogens bacteria such as *Bacillus cereus*, *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., and phytopathogenic, mycotoxigenic and spoilage fungi as *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum*, *Alternaria alternata* and *Cladosporium cladosporioides* was studied. *In vitro* assays were performed using a Suspension Test at 2 concentration of ozone in water and 4 exposure times. It was possible to determine the following descending order of resistance in bacteria: *B. cereus*, *Pseudomonas* sp., *E. coli*, *S. aureus* and *Salmonella* sp. It was possible to determine the following descending order of resistance in fungi: *A. niger*, *P. digitatum*, *A. alternata* and *C. cladosporioides*. Tests were performed on lettuce leaves, containing inoculated bacteria under study, with ozonated water ([2 ppm], for 5 minutes), and whole oranges, containing inoculated conidia of fungi in study with ozonated water ([3 ppm], for 15 minutes). In none of the tests were reduced 3 log concentrations of microorganisms. Considering that high concentrations of microorganisms inoculated in tests (10^6 - 10^7 cells/mL for bacteria and 10^5 - 10^6 conidia/mL for fungi) are not normally found in these fresh foods, can be inferred that the ozone could be used as a sanitizer.

Keywords: control of pathogenic and spoilage microorganisms, minimally processed products, ozonated water, sanitization of fruits and vegetables.

INTRODUCCIÓN

En la industria de alimentos y bebidas, la calidad es un requisito para la aceptación del producto por parte del consumidor, y hablar de calidad total o calidad integral, significa que todas las operaciones industriales de fabricación estén sujetas a procedimientos aceptables de acuerdo con los requerimientos de las autoridades sanitarias (Vasconcellos, 2004). Estas industrias comúnmente favorecen

el crecimiento de microorganismos en las superficies de trabajo, paredes, pisos y equipamientos por la presencia de restos de materias primas que les sirven de nutrientes (Heaton *et al.*, 1990). Estos microorganismos pueden ser transportados desde el ambiente exterior al interior de la misma por el aire ambiental, los operarios, los insumos y los servicios, razón por la cual resulta necesario aplicar medidas apropiadas para evitar contaminaciones cruzadas y minimizar su

presencia, ya que si no se realiza una higiene adecuada, los microorganismos permanecen y los alimentos pueden ser portadores de agentes causantes de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA). Se debe implementar un programa adecuado de limpieza y desinfección, en forma regular y suficiente que permita un ambiente de trabajo apto para la producción de alimentos y evitar así problemas sanitarios por consumo de productos contaminados con microorganismos en sí, con sus productos metabólicos o sus toxinas (Marriott, 1997; Caballero-Torres y Lengomín-Fernández, 1998; Wildbrett, 2000; López-V. *et al.*, 2001; 2002; Bousser, 2002; Singh, 2005; Briñez-Zambrano, 2006).

La demanda de productos mínimamente procesados es creciente tanto en los mercados nacionales como internacionales. La inocuidad de estos productos es un tema que preocupa tanto a procesadores, como a agencias de regulación y a consumidores. Debido al crecimiento en su consumo, las industrias han buscado métodos más eficaces para evitar el deterioro por microorganismos y prolongar la vida útil, como también, controlar los brotes de ETA por causa de estos productos. Se plantea entonces, un mayor interés en mejorar las técnicas de sanitización tradicionales y encontrar nuevos procedimientos que las superen en eficiencia (Aguayo *et al.*, 2007).

Las frutas y hortalizas presentan una tendencia inherente a deteriorarse por razones mecánicas, fisiológicas, biológicas y ambientales. El porcentaje de las pérdidas por deterioro de estos productos es estimado entre 5 y 25 % en países industrializados y entre 20 y 50 % en países en desarrollo. Para disminuir estas pérdidas y poder satisfacer las crecientes necesidades de consumo de estos productos se debe tomar conciencia de la importancia de cada aspecto inherente al manejo y a la vida de estos productos perecederos, tanto en su ciclo productivo, como después de su recolección (Parra-Coronado y Hernández-Hernández, 2007). La contaminación superficial de frutas y

hortalizas varía en número y tipo, dependiendo del producto y del manejo, previo y posterior a la cosecha que dicho producto haya recibido (Garmendia y Vero, 2006).

Existen varios métodos para reducir la flora superficial de frutas y hortalizas. Cada método tiene ventajas y desventajas dependiendo del tipo de producto y del proceso. En general los métodos utilizados se agrupan en procesos físicos y químicos (Frisón y Chiericatti, 2009; 2010). Entre los métodos físicos se pueden mencionar: remoción mecánica, tratamientos térmicos, radiación con luz ultravioleta. Asimismo, existen determinadas sustancias químicas que pueden actuar sobre los microorganismos para reducir o inhibir su crecimiento como hipoclorito de sodio, ácido peracético, compuestos a base de amonio cuaternario y ozono (Davidson y Harrison, 2002; Garmendia y Vero, 2006; Manivannan, 2007). El agua que entra en contacto con frutas y hortalizas debe ser potable. La desinfección del agua es considerada un punto de control crítico ya que minimiza la reducción de patógenos (Plaza *et al.*, 2007). No existe un producto perfecto y solo la combinación: eficacia – toxicidad – costo, permite una escala de valor que se optimiza con las condiciones de uso (temperatura, tiempo de contacto, entre otros) (Criquelion *et al.*, 2002).

La industria alimentaria dirige sus investigaciones al desarrollo de nuevas tecnologías y a la aplicación de sanitizantes seguros y efectivos. El ozono, dado su elevado poder germicida y su descomposición espontánea a oxígeno, se ha convertido en un agente potencial para garantizar la seguridad microbiológica y la calidad de los alimentos (Kim *et al.*, 1999; Rice, 2005; Naito, 2009). El ozono es un poderoso agente oxidante y su acción antimicrobiana es extremadamente rápida. Consta de 3 átomos de oxígeno, es inestable y se descompone con cierta facilidad en oxígeno normal y oxígeno nascente. Debido a esta característica, actúa con gran eficiencia

como desinfectante y se constituye como el más serio competidor del cloro ya que no forma compuestos tóxicos de degradación. Por su tendencia a transformarse de nuevo en oxígeno molecular, esta tecnología es limpia, segura y eficiente, y no agrede al medio ambiente, ya que deja como residuo moléculas de oxígeno. Estos aspectos favorecen su empleo en la industria alimentaria (Larocque y Eng., 1999; Kim y Yousef, 2000; Khadre y Yousef, 2001; Graham, 2002; Aguayo *et al.*, 2005; Loeb, 2005; Ricaurte-Galindo, 2006; Aguayo *et al.*, 2007).

El ozono se puede generar por el método de descarga corona, que es el más utilizado para aplicaciones comerciales. En esta técnica, se usa un generador que está formado por dos electrodos, uno de alta y otro de baja tensión, separados por un medio dieléctrico pegado al electrodo de alta tensión, de forma que se crea un espacio entre la capa de material y el electrodo de baja tensión, llamado hueco de descarga. Cuando se aplica una corriente alterna de alto voltaje a través del hueco de descarga en presencia de aire u O_2 , se excitan los electrones del O_2 produciéndose la ruptura de la molécula de O_2 ; los 2 átomos libres se combinan con 2 moléculas de O_2 y se forman 2 moléculas de O_3 (Güzel-Seydim *et al.*, 2003; 2004).

Considerando la creciente demanda de productos mínimamente procesados y la necesidad de asegurar la calidad de las frutas y hortalizas, se propuso estudiar los efectos del agua ozonizada frente a bacterias causantes de ETA y frente a mohos fitopatógenos, micotoxicogénicos y alterantes de frutas y hortalizas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipo utilizado

El equipo utilizado genera ozono por la técnica de descarga eléctrica tipo corona. La concentración de ozono se determinó midiendo

la Absorbancia con un espectrofotómetro marca Spectrum Serie SP-1103, a 600 ± 10 nm. Se aplicó el método colorimétrico del índigo que es preciso, rápido y sensible (el límite de detección es $0,005 \mu\text{g/mL } O_3$) (APHA/AWWA/WEF, 1998). Este equipo fue diseñado y provisto por la Empresa Agua Ozonizada Santo Tomé (Santa Fe, Argentina) y operado por personal de la misma firma.

Cepas utilizadas

Las bacterias utilizadas para realizar los ensayos fueron: *Bacillus cereus*, *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* sp. Los mohos utilizados para realizar los ensayos fueron: *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum*, *Alternaria alternata* y *Cladosporium cladosporioides*. Estos microorganismos fueron suministrados por el Cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Ensayo *in vitro* del agua ozonizada

Se realizaron ensayos *in vitro* mediante Test de Suspensión acorde a las normas NF T72-151, T72-200, T72-201, T72-230 y T72-231 (AFNOR, 1997). Para cada una de las bacterias en estudio se colocó 1 mL de cultivo en fase exponencial, de concentración $10^6 - 10^7$ células/mL, y para cada uno de los mohos en estudio se colocó 1 mL de suspensión de conidios en fase exponencial de crecimiento, de concentración $10^5 - 10^6$ conidios/mL, en el reactor de prueba que contenía 500 mL de agua con el ozono disuelto a la concentración de ensayo determinada. Para el ensayo con bacterias, se tomaron muestras a 4 tiempos diferentes (30 segundos, 1, 3, y 5 minutos) y se realizaron recuentos microbiológicos cultivando en placas con medio Agar Soya (Biokar Diagnostics, Francia), e incubando a 37°C por 24 a 48 h. Para el ensayo con los mohos,

se tomaron muestras a 4 tiempos diferentes (1, 5, 15 y 30 minutos) y se realizaron recuentos microbiológicos cultivando en placas con medio Agar Extracto de Malta ('Malt Extract Agar', MEA), e incubando por 7 días a 25 °C. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiental (25 °C) y por triplicado. Se estudiaron 2 concentraciones de ozono en agua: 1 y 2 ppm.

Efecto del agua ozonizada sobre lechuga (*Lactuca sativa* L.) y naranjas enteras (*Citrus sinensis* L.)

Las muestras de hojas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) y frutos de naranja (*Citrus sinensis* L.) fueron adquiridas de establecimientos comerciales y se seleccionaron sin daños aparentes. Posteriormente se realizaron ensayos sobre hojas de lechuga limpias, lavadas con agua estéril, que contenían inoculadas las bacterias en estudio y sobre naranjas enteras limpias, lavadas con agua estéril, que contenían inoculados los conidios de los mohos en estudio. En todos los casos las condiciones de concentración de ozono y temperatura se mantuvieron constantes durante todo el tiempo de ensayo.

Ensayo sobre hojas de lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Se inocularon, por separado, hojas de lechuga limpias (10 gramos) lavadas con agua estéril con 1 mL de cultivo bacteriano de cada especie, de concentración 10^6 células/mL para *Bacillus cereus*, *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y 10^7 células/mL para *Salmonella* sp. Se dejaron secar durante 3 horas sobre placas de Petri estériles en corriente de aire estéril provisto por un equipo de flujo laminar Casiba HL2B (Casiba, S. A., Caseros, Argentina). Luego se sumergieron en agua ozonizada en condiciones de concentración y tiempo establecidos en el ensayo *in vitro* que resultó eficiente para la bacteria en estudio. Una

vez finalizado el ensayo, se realizó el recuento de las bacterias sobrevivientes a la acción del ozono tomando del sobrenadante alícuotas de 1 mL que se sembraron en medio Agar Soya (Biokar Diagnostics, Francia) y se incubaron por 24 a 48 horas a 37 °C.

Ensayo sobre naranjas (*Citrus sinensis* L.) enteras

Se inocularon, por separado, naranjas enteras lavadas con agua estéril con 1 mL de suspensión de conidios de cada especie, de concentración 10^6 conidios/mL para *Aspergillus niger*, *Penicillium digitatum*, *Cladosporium cladosporioides* y 10^5 conidios/mL para *Alternaria alternata*. Se dejaron secar durante 3 horas sobre placas de Petri estériles en corriente de aire estéril provisto por el equipo de flujo laminar Casiba HL2B (Casiba, S. A., Argentina). Luego se sumergieron en agua ozonizada en condiciones de concentración y tiempo establecidos en el ensayo *in vitro* que resultó eficiente para los mohos en estudio. Una vez finalizado el ensayo, se realizó el recuento de los conidios sobrevivientes a la acción del ozono tomando del sobrenadante alícuotas de 1 mL que se sembraron en medio MEA e incubaron luego por 5 días a 25 °C.

Cálculo de la eficiencia

Se calculó la eficiencia del tratamiento sanitizante sobre las hojas de lechuga y sobre naranjas enteras aplicando la siguiente fórmula:

$$E \% = [(C_0 - C_f) / C_0] \times 100$$

Donde:

E % : es el porcentaje de eficiencia de muerte

C_0 : es la concentración inicial del microorganismo en estudio

C_f : es la concentración final del microorganismo en estudio

Para que la operación de sanitización se

considere segura en la industria alimentaria, deberá reducir 5 órdenes logarítmicos la concentración inicial de bacterias (E % 99,999) y 4 órdenes logarítmicos (E % 99,99) la concentración inicial de los mohos (Bloomfield y Looney, 1992; López-V. *et al.*, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo *in vitro* del agua ozonizada

En los Cuadros 1 y 2 se pueden observar los resultados obtenidos *in vitro* tanto en la inactivación de las bacterias como de los mohos

estudiados a los diferentes tiempos de ensayo.

En ensayo *in vitro* se logró determinar el siguiente orden descendente de resistencia de bacterias: *B. cereus*, *Pseudomonas* sp., *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella* sp. siendo *B. cereus* el más resistente ya que se trata de una bacteria formadora de esporos. Varios autores concluyen en que existe una relación entre las características morfológicas de los microorganismos y su resistencia al ozono. Por ello, es más efectivo sobre bacterias vegetativas que sobre bacterias esporuladas (Setlow, 2006; Oulé *et al.*, 2010) y sobre bacterias que tienen la capacidad de formar biofilms protectores

Cuadro 1.- Eficiencia (E %) en la inactivación de bacterias.

Tiempo (min)	[O ₃] (2 ppm)		[O ₃] (1 ppm)		
	<i>B. cereus</i> (E %)	<i>Pseudomonas</i> sp. (E %)	<i>E. coli</i> (E %)	<i>S. aureus</i> (E %)	<i>Salmonella</i> sp. (E %)
0,5	99,913	99,945	99,912	99,993	99,997
1	99,952	99,979	99,999*	99,999*	99,999*
3	99,997	99,998	99,999*	99,999*	99,999*
5	99,999*	99,999*	99,999*	99,999*	99,999*

* Disminución de 5 log (operación de sanitización segura).

Cuadro 2.- Eficiencia (E %) en la inactivación de mohos.

Tiempo (min)	[O ₃] (2 ppm)		[O ₃] (1 ppm)	
	<i>A. niger</i> (E %)	<i>P. digitatum</i> (E %)	<i>A. alternata</i> (E %)	<i>C. cladosporioides</i> (E %)
1	84,83	86,72	66,51	92,70
5	99,98	99,99*	99,69	99,99*
15	99,99*	99,99*	99,99*	99,99*
30	99,99*	99,99*	99,99*	99,99*

* Disminución de 4 log (operación de sanitización segura).

como *Pseudomonas* sp. A medida que el tiempo de contacto entre los esporos y el ozono aumenta, la reducción de la población es mayor; las múltiples capas de proteínas de los esporos actúan como filtro químico y son una barrera primaria contra el ozono (Finch *et al.*, 2001; Gil, 2003; Setlow, 2006; Plaza *et al.*, 2007; Naito, 2009).

Los resultados fueron coincidentes con los obtenidos por Lee y Deininger (2000), quienes encontraron que *Bacillus* spp. fue más resistente, y con Lezcano *et al.* (1999), quienes al evaluar la resistencia al agua ozonizada de bacterias, determinaron que *Pseudomonas* sp. fue más resistente que *E. coli*.

Kim y Yousef (2000) encontraron que el ozono a una concentración de 0,2 ppm inactivaba 0,9 log de *P. fluorescens* en 30 segundos, mientras que al incrementar la concentración a 1,2 ppm la población decrecía 5 log para un tiempo similar. En este trabajo se necesitaron 5 minutos a una concentración de 1 ppm para disminuir 5 log *Pseudomonas* sp. y solo 1 minuto a la misma concentración para disminuir 5 log de *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella* sp. El tiempo de exposición es una variable que influye en dicho tratamiento, ya que a mayor tiempo de exposición hay mayor eficiencia.

Se logró determinar el siguiente orden descendente de resistencia de mohos: *A. niger*, *P. digitatum*, *A. alternata* y *C. cladosporioides*. Siendo *A. niger* el más resistente de los mohos estudiados. Este orden de resistencia no fue concordante con Plaza *et al.* (2007) quienes encontraron que *Alternaria* sp. fue el moho más resistente a la acción del ozono, ya que con tiempos de exposición prolongados de 30 minutos solo lograron reducir la población en 63,2 %; pero se coincide con los autores en que son necesarios tiempos de exposición superiores a 10 minutos para conseguir reducciones en más del 80 % de la población fúngica de la mayoría de los patógenos poscosecha. En este trabajo se necesitaron 15 minutos a concentración de 1 ppm para

disminuir 4 log los recuentos de *A. alternata* y el mismo tiempo pero a concentración de 2 ppm para disminuir 4 log los recuentos de *A. niger*. Smilanick *et al.* (1999) lograron reducir entre el 95 y el 100 % la concentración de esporos de *P. digitatum* a concentración de 1,5 µg/mL (ppm) por 2 minutos, mientras que en este trabajo se necesitaron concentraciones y tiempos mayores. La sensibilidad de los conidios fúngicos al ozono varía de acuerdo al género y a las condiciones ambientales (Restaino *et al.*, 1995); y bajo ciertas dosis puede inhibir directa o indirectamente la actividad enzimática del hongo (Roushdy *et al.*, 2011).

Efecto del agua ozonizada sobre hojas de lechuga (*Lactuca sativa* L.)

Se utilizó una concentración de 2 ppm y un tiempo de ensayo de 5 minutos ya que bajo estas condiciones se inactivó de manera eficiente la bacteria más resistente en estudio (*B. cereus*). En esta decisión se tuvo en cuenta también, que el ozono por encima de un umbral de concentración deteriora las características sensoriales de las hortalizas (Wei *et al.*, 2007; Bataller-Venta *et al.*, 2010) por lo tanto se adoptó una solución de compromiso entre la concentración de ozono y tiempo de exposición con el menor deterioro sensorial. Los resultados se observan en la Fig. 1.

Para *E. coli* se obtuvo una eficiencia porcentual de 99,933, lo que indicó una reducción en la población de más de 3 log. Este resultado no fue coincidente con los publicados por Singh *et al.* (2002) quienes redujeron 0,92 log la población de *E. coli* O157:H7 en lavado de lechuga con agua ozonizada a concentración de 9,7 ppm durante un tiempo de exposición de 5 min; ni con Achen y Yousef (2001) quienes obtuvieron reducciones de 2,6 log en la población de *E. coli* O157:H7, inoculadas en manzanas pero las trataron en agua con 22 a 24 ppm de ozono durante 3 minutos.

En el tratamiento, para *S. aureus* se obtuvo una eficiencia porcentual de 99,900 lo

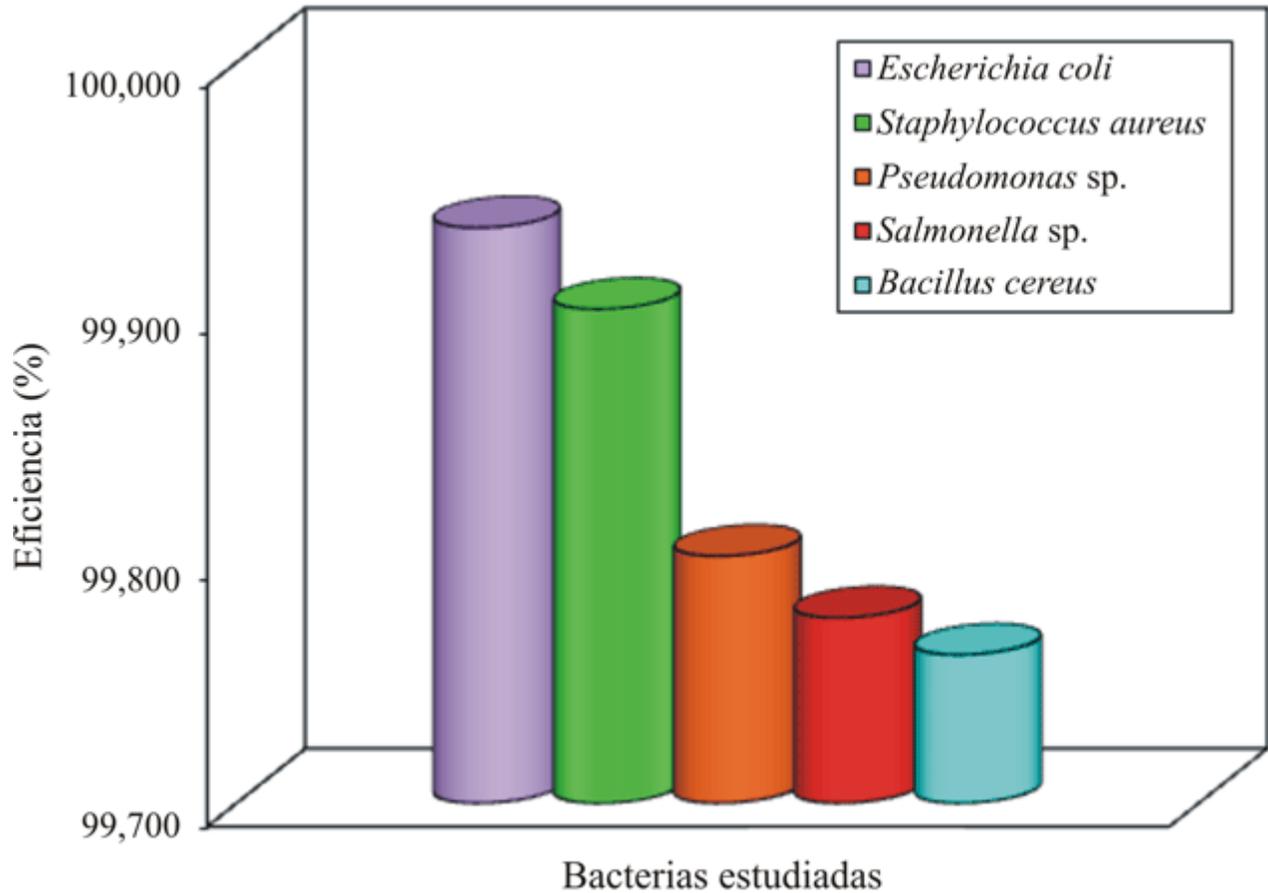


Figura 1.- Eficiencia del tratamiento con agua ozonizada (2 ppm O₃ x 5 min) sobre hojas de lechuga.

cual indicó 3 log de reducción decimal en su concentración, para *Pseudomonas sp* se obtuvo 99,800 % (2 log de reducción decimal), para *Salmonella sp.* 99,775 % (2 log de reducción decimal) y para *B. cereus* 99,760 % (2 log de reducción decimal). Bajo estas condiciones de ensayo no se logró reducir los 5 log (99,999 % de eficiencia) necesarios para que la sanitización se considere segura para la industria alimenticia. Esto implica que permanecen microorganismos viables sobre las hojas de lechuga lo que sería un riesgo potencial si este producto es consumido por niños, mujeres embarazadas, adultos mayores o inmunodeprimidos. Estos resultados son coincidentes con Baur *et al.* (2004) quienes

lavaron hojas de lechuga con agua ozonizada a 1 mg/L (ppm) por 2 minutos sin lograr una reducción significativa.

Varios autores coinciden en que cuando se desea inactivar los microorganismos presentes en un alimento se deben utilizar dosis altas de ozono para eliminarlos ya que los constituyentes orgánicos del alimento y el medio reaccionan fácilmente con el ozono reduciendo su capacidad sanitizante (Aguayo *et al.*, 2005; Garmendia y Vero, 2006). Aunque un exceso de ozono, puede ocasionar daños en los tejidos del producto con algún deterioro o pérdida de calidad. Por lo que la aplicación adecuada del ozono es una alternativa de tratamiento sustentable en la poscosecha de

frutas y hortalizas. Sin embargo, se recomienda realizar un estudio previo de las condiciones de tratamiento para cada producto (Bataller-Venta *et al.*, 2010).

Efecto del agua ozonizada sobre naranjas (*Citrus sinensis* L.) enteras

Teniendo en cuenta que los conidios de mohos por su estructura son más resistentes al ozono que las células vegetativas y que el ozono causa deterioro sobre las características sensoriales e las frutas cuando se utiliza en

concentraciones muy elevadas, se decidió reducir un 50 % el tiempo de ensayo y aumentar un 50 % la concentración trabajando a una concentración de 3 ppm y un tiempo de ensayo de 15 minutos. Los resultados se observan en la Fig. 2.

En el tratamiento para *C. cladosporioides* se obtuvo una eficiencia porcentual de 99,90 lo que indicó una reducción de 3 log, para *A. alternata* una eficiencia 99,63 % (reducción de 2 log), para *P. digitatum* 99,18 % y para *A. niger* de 99,04 %; con reducción de 2 log para ambos mohos.

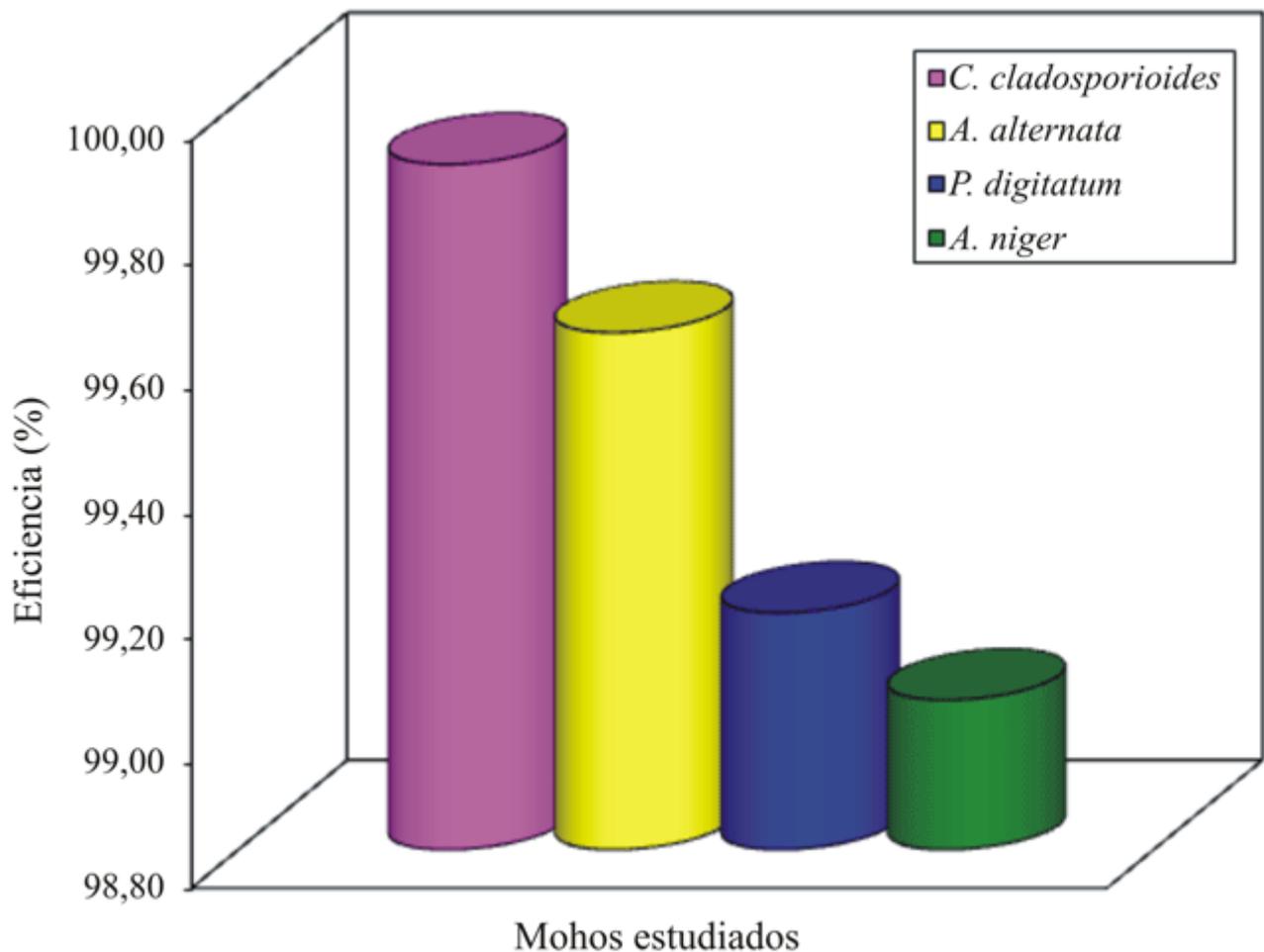


Figura 2.- Eficiencia del tratamiento con agua ozonizada (3 ppm O₃ x 15 min) sobre naranjas enteras.

Bajo dichas condiciones de ensayo no se logró reducir los 4 log (99,99 % de eficiencia) necesarios para que la sanitización se considere segura para la industria alimenticia, con los mohos estudiados. Esto implica que permanecen viables conidios sobre la superficie de las naranjas que pueden deteriorar sus características sensoriales y reducir su vida útil. La eficacia del ozono es demostrada más fácilmente cuando los microorganismos son suspendidos y tratados en agua pura que en sistemas complejos como alimentos (Khadre *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos no fueron coincidentes con lo publicado por Smilanick *et al.* (1999), quienes informaron que con agua ozonizada sobre frutas se logró reducir la germinación de esporas de varias especies fúngicas (*P. digitatum*, *P. italicum*, *P. expansum*, *Botrytis cinerea* y *Monilinia fructicola*, entre otras) entre un 95 y 100 %, en un tiempo de contacto de 2 minutos con agua ozonizada de 1,5 µg/mL (ppm) de concentración; destacando que ninguna sobrevivió en 3 minutos de contacto. Estos mismos autores lograron reducir solo el 91 % de la carga superficial de mohos sobre frutillas (fresas) sumergidas por 2 minutos en agua ozonizada de 4 µg/mL de concentración.

La mejor forma de lograr un producto de baja carga microbiana es evitar que el mismo se contamine siguiendo buenas prácticas agrícolas previas y posteriores a la cosecha. En la mayoría de los casos, la reducción de la carga microbiana lograda sobre frutas y hortalizas no supera el 90 ó 99 % (Garmendia y Vero, 2006).

CONCLUSIONES

- El agua ozonizada resultó eficiente y cumplió con los requisitos para que la sanitización sea segura en la industria alimenticia al trabajar con los microorganismos *in vitro* (bacterias y mohos).

- Cuando se realizaron ensayos sobre hojas de lechuga y sobre naranjas enteras, en ninguno de los ensayos se logró la eficiencia porcentual requerida.
- Tomando en cuenta que las altas concentraciones de bacterias 10^6 - 10^7 células/mL y de conidios de mohos 10^5 - 10^6 conidios/mL inoculadas en los ensayos, para establecer la eficiencia del agua ozonizada como agente sanitizante, no se encuentran normalmente en estos alimentos frescos se puede inferir que el ozono sería eficiente como sanitizante.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación de este trabajo a la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina; a través del Programa CAI+D 15-92, 2009-2012 y su Directora la Dra. María de la Luz Zapata de Basílico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achen, M. and Yousef, A.E. 2001. Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. *Journal of Food Science*. 66(9):1380-1384.
- AFNOR. 1997. Association Française de Normalisation. Antiseptiques et désinfectants. Recueil de normes. Paris: AFNOR.
- Aguayo, E.; Escalona, V.H. y Artés, F. 2005. Revisión: el ozono y su utilización en la industria agroalimentaria. *Alimentaria*. 366:34-47.
- Aguayo, Encarna; Escalona, Víctor H.; Gómez, Perla; Artés-Hernández, Francisco y Artés-Calero, Francisco. 2007. Técnicas emergentes y sostenibles para la desinfección de frutas y hortalizas mínimamente procesadas. 17° Symposium Internacional. Tecnologías y Sanidad de

- las Frutas y Hortalizas en Postcosecha. *Phytoma*. 189:138-142.
- APHA/AWWA/WEF. 1998. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington/Denver/Alexandria, USA.
- Bataller-Venta, Mayra; Cruz-Broche, Sandra Santa y García-Pérez, Mario A. 2010. El ozono: una alternativa sustentable en el tratamiento poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 41(3):156-164.
- Baur, Sascha; Klaiber, Ralph; Hammes, Walter Peter and Carle, Reinhold. 2004. Sensory and microbiological quality of shredded, packaged iceberg lettuce as affected by pre-washing procedures with chlorinated and ozonated water. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 5(1):45-55.
- Bloomfield, Sally F. and Looney, Eilesh. 1992. Evaluation of the repeatability and reproducibility of European suspension test methods for antimicrobial activity of disinfectants and antiseptics. *Journal of Applied Microbiology*. 73(1):87-93.
- Bousser, C. 2002. Combinación de la limpieza y la desinfección. En Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección. (pp. 303-320). España: AMV Ediciones-Mundi Prensa.
- Briñez-Zambrano, Wilfrido José. 2006. Estudio de la inactivación por ultra alta presión de homogeneización de microorganismos en alimentos líquidos. Valoración de los procesos de limpieza y desinfección del equipo. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España.
- Caballero-Torres, Ángel y Lengomín-Fernández, María Elena. 1998. Causas más frecuentes de problemas sanitarios en alimentos. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. 12(1):20-23.
- Criquelion, J.; Durand, F.; Olivier, F.; Rauwel, G.; Sabat, F. 2002. Características generales de las funciones químicas desinfectantes. En Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección. (pp. 303-320). España: AMV Ediciones-Mundi Prensa.
- Davidson, P. Michael and Harrison, Mark A. 2002. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology*. 56(11):69-78.
- Finch, G.R.; Haas, C.N.; Oppenheimer, J.A.; Gordon, G. and Trussell, R.R. 2001. Design criteria for inactivation of *Cryptosporidium* by ozone in drinking water. *Ozone: Science & Engineering*. 23(4):259-284.
- Frisón, Laura N. y Chiericatti, Carolina. 2009. La sanitización en la industria alimentaria. *Revista CICHA*. 78:38-40.
- Frisón, Laura Noemí y Chiericatti, Carolina. 2010. Nuevas tecnologías en desinfección. Uso de la luz UV. *Revista CICHA*. 82:30-34.
- Garmendia, Gabriela y Vero, Silvana. 2006. Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. *Horticultura*. 197:18-27.
- Gil, M^a Isabel; Periago, Paula M^a y Beltrán, David. 2003. Uso del ozono en la higienización de frutas y hortalizas. *Horticultura*. 169:44-48.
- Graham D.M. 2002. Successful ozone applications in food processing. In *Ozone III: Agricultural & Food Processing Applications of Ozone as an Antimicrobial Agent*. October 28-30. Fresno, CA, USA.
- Güzel-Seydim, Zeynep B.; Greene, Annel K. and Seydim, A.C. 2003. Use of ozone in the food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie (LWT) - Food Science and Technology*. 37(4):453-460.
- Güzel-Seydim, Zeynep; Bever, Paul I. Jr. and Greene, A. 2004. Efficacy of ozone to

- reduce bacterial populations in the presence of food components. *Food Microbiology*. 21(4): 475-479.
- Heaton, Pamela E.; Butler, Gillian M. and Callow, Maureen E. 1990. The floristic composition of moulds growing on wall of food and drink processing factories. *International Biodeterioration*. 26(1):1-9.
- Khadre, M.A. and Yousef, A.E. 2001. Sporocidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. *International Journal of Food Microbiology*. 71(2-3):131-138.
- Khadre, M.A.; Yousef, A.E. and Kim, J.G. 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *Journal of Food Science*. 66(9):1242-1252.
- Kim, J.G. and Yousef, A.E. 2000. Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. *Journal of Food Science*. 65(3):521-528.
- Kim, Jin Gab; Yousef, Ahmed E and Dave, Sandhya. 1999. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *Journal of Food Protection*. 62(9):1071-1087.
- Larocque, Ronald L. and Eng. P. 1999. Ozone applications in Canada a state of the art review. *Ozone: Science & Engineering*. 21(2):119-125.
- Lee, JiYoung and Deininger, Rolf A. 2000. Survival of bacteria after ozonation. *Ozone: Science & Engineering*. 22(1):65-75.
- Lezcano, I.; Pérez-Rey, R.; Baluja, Ch. and Sánchez, E. 1999. Ozone inactivation of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* and *Salmonella thyphimurium* in water. *Ozone: Science & Engineering*. 21(3):293-300.
- Loeb, B. 2005. Ozone IV highlights recent developments in the use of ozone for food and agricultural processing. *Ozone News*. 33(1):18-22.
- López-V., Luis; Romero-R., José y Ureta-V, Fernando. 2001. Tratamientos de desinfección de lechugas (*Lactuca sativa*) y frutillas (*fragaria chiloensis*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 51(4):376-381.
- López-V., Luis; Romero-R., José y Ureta-V, Fernando. 2002. Acción germicida *in vitro* de productos desinfectantes de uso en la industria de alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 52(1):74-76.
- Manivannan, Gurusamy. 2007. Disinfection and decontamination. Principles applications and related issues. Boca Raton, FL, USA: CRC Press/Taylor & Francis Group.
- Marriott, Norman G. 1997. Essentials of food sanitation. New York, NY, USA: Chapman & Hall.
- Naito, S. 2009. Ozone inactivation of food spoilage acid-producing bacteria. In 19th Ozone World Congress & Exhibition. International Ozone Association (IOA). August 31-September 3. Tokyo, Japan.
- Oulé, Mathias; Tano, Kablan and Arul, Joseph. 2010. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores with pressurized CO₂ and influence of O₂, N₂O and CH₃CH₂OH on its sporocidal activity. *European Journal of Scientific Research*. 40(1):6-14.
- Parra-Coronado, Alfonso y Hernández-Hernández, José. 2007. Fisiología y postcosecha de frutas y hortalizas. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Plaza, Pilar; Bobillo, Elena; Costa, Elena y Usall, Josep. 2007. Eficacia del ozono en la desinfección de agua en centrales hortofrutícolas. *Horticultura Internacional*. 59:34-40.
- Restaino, Lawrence; Frampton, Elon W.; Hemphill, Jenifer B. and Palnikar, Paul. 1995. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(9):3471-3475.
- Ricaurte-Galindo, Sandra Lissette. 2006. Ozonoterapia, una opción para el sector

- agropecuario!!!. REDVET, Revista Electrónica de Veterinaria. VII(10):100604.
- Rice, R. 2005. User successes with ozone for agricultural products and food treatment. In 17th International Ozone Association (IOA) World Congress & Exhibition "Ozone & Related Oxidants. Innovative & Current Technologies". August 22-25. Strasbourg, France.
- Roushdy, M.M.; Abdel-Shakour, E.H. and Abdel-Ghany, T.M. 2011. Sporicidal effect of ozone on fungal and bacterial spores in water disinfection. *Journal of American Science*. 7(1):942-948.
- Setlow, P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*. 101(3):514-525.
- Singh, Jagjit. 2005. Toxic moulds and indoor air quality. *Indoor and Built Environment*. 14(3-4):229-234.
- Singh, N.; Singh, R.K.; Bhunia, A.K. and Strohine, R.L. 2002. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie (LWT) - Food Science and Technology*. 35(8):720-729.
- Smilanick, Joseph L.; Crisosto, Carlos and Mlikota, Franka. 1999. Postharvest use of ozone on fresh fruit. *Perishables Handling Quarterly*. 99:10-14.
- Vasconcellos, J. Andres. 2004. Quality assurance for the food industry. A practical approach. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press LLC.
- Wei, Kuangji; Zhou, Hongde; Zhou, Ting and Gong, Jianhua. 2007. Comparison of aqueous ozone and chlorine as sanitizers in the food processing industry: impact on fresh agricultural produce quality. *Ozone: Science & Engineering*. 29(2):113-120.
- Wildbrett, Gerhard. 2000. Limpieza y desinfección en la industria alimentaria. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S. A.